PHOSPHOPLASTIN RL

CE

Prothrombin Time Reagent

ENGLISH VERSION

INTENDED USE

Phosphoplastin RL is intended for use in the one-stage prothrombin time (PT) test and in PT based hemostasis assays. The PT can be used to screen for coagulopathies, for extrinsic factor assays, and for therapeutic monitoring of Warfarin and related drugs.

PRINCIPLE

Tissue thromboplastin in the presence of calcium and FVIIa activates the tissue factor (extrinsic) pathway of coagulation. Deficiencies in the extrinsic and common pathways prolong the PT.

COMPOSITION

Phosphoplastin RL consists of a liquid saline extract of rabbit brain, calcium ions, preservatives and stabilizers. Phosphoplastin RL is supplied as packaged kits:

Catalog number 11-305: 10 x 5 mL vials.
Catalog number 11-310: 10 x 10 mL vials.

PREPARATION FOR USE

Phosphoplastin RL comes ready for use. The vial should be inverted several times until a homogeneous suspension is obtained.

STORAGE AND STABILITY

Phosphoplastin RL should be stored at 2 to 8°C and is stable until the expiration date indicated on the vial. After opening, the original activity is stable for fourteen (14) days when stored at 2 to 8°C. DO NOT FREEZE. The reagent is a fine suspension of rabbit brain particles. Large flaky particles in the suspension or prolonged PT times on testing normal plasma or controls may indicate product deterioration.

SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING

Plasma is obtained from whole blood anti-coagulated with 1 part 3.2% sodium citrate to 9 parts whole blood. Process the collected whole blood and handle the plasma according to CLSI guideline H21-A4 (or superseding edition).

MATERIALS AND EQUIPMENT REQUIRED, BUT NOT PROVIDED

1. Coagulation Instrument or 37°C Water Bath and timer
2. Reaction Cups or Plastic test tubes (12 x 75 mm)
3. Pipetting device to deliver 200 µL or 100 µL.
4. Centrifuge
5. Distilled or de-ionized water
6. Control plasmas such as r2 Diagnostics PlasmaCon N (30-201), L1 (31-201), and L2 (32-201).

TEST PROCEDURE FOR PT

NOTE: Throughout the procedure, all test tubes, syringes, and pipettes should be plastic.

I. Automated And Semi-Automated Methods

Refer to the appropriate Instrument Operator's Manual for detailed instructions.

II. Manual Method

1. Collect and prepare the blood specimen according to the directions outlined in SPECIMEN COLLECTION AND HANDLING.
2. Reconstitute the control plasmas according to their package inserts.
3. Perform all tests in duplicate.
4. Prewarm the PT reagent to 37°C for at least 10 minutes.
5. Prewarm 100 µL of the test plasma or control plasma for 2-3 minutes at 37°C.
6. Add 200µL Phosphoplastin RL reagent to the plasma, simultaneously starting a stopwatch and record the time required for clot formation in seconds.

QUALITY CONTROL

Each laboratory should establish a quality control program that includes normal and abnormal controls to evaluate instrument, reagent and technologist performance. The normal and abnormal controls should be tested daily prior to performing tests on patient plasmas. Control ranges should be reestablished upon any change in lot number of reagent or control, or upon major instrument service. If the controls do not recover within their reference ranges, patient results should be considered invalid and not reported.

RESULTS

The results of the Prothrombin Time tests can be reported in units of seconds, % activity, or INR. Results greater than the upper limits of the range should be considered abnormal and follow-up testing should be performed. PT values below the lower limits of the range may indicate a compromised sample or instrument and should be investigated.

LIMITATIONS

Phosphoplastin RL is for *in vitro* diagnostic use only. As expected values for the prothrombin time test will vary from one laboratory to another, depending on numerous variables such as the choice of clot detection method or environmental conditions, laboratories should establish their own expected values for patients and well defined ranges for control plasmas. The use of Icteric, Lipemic, or Hemolyzed sample should be avoided due to possible interference especially when using photo-optical instruments. The impact of other therapeutic drugs, in addition to oral anticoagulant therapy, can influence interpretation of PT test results.

EXPECTED VALUES

A reference range study was conducted using triplicate specimens from 120 normal health adults. Approximately equal numbers of males and females were used. The PT results were as follows:

	Mean (seconds)	Range for +/- 2 SD
Photo-optical	12.3	9.7-14.9 seconds
Mechanical	12.6	11.1-14.1 seconds

These values should only serve as guidelines. Because differences may exist between instruments, laboratories, and local populations, it is necessary that each laboratory establish its own reference range of expected prothrombin time results.

DETERMINATION OF INR

The INR is calculated by using the ratio of the Patient PT to the mean of the normal reference range raised to the power of the reagent International Sensitivity Index (ISI).

$$\textbf{INR = (Patient PT / mean of normal range)}^{\text{ISI}}$$

The ISI is assigned by comparison to a highly sensitive WHO thromboplastin standard reference material. The lower the ISI for a given reagent the more sensitive the reagent is to coagulation factors. The lot specific ISI value for Phosphoplastin RL can be found on the outer box front panel.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

I. Precision

Precision studies were performed to establish Within-Run and Between-Run CV's for normal control plasma and abnormal control plasma. A single lot number of Phosphoplastin RL reagent was used for these studies. Results are shown below.

Photo-optical clot detection

Control Plasma	Mean PT (sec)	Within Run CV (%)	Between Run CV (%)
PlasmaCon N	12.7	0.7	1.03
PlasmaCon L2	52.9	1.9	1.31

Mechanical clot detection

Control Plasma	Mean PT (sec)	Within Run CV (%)	Between Run CV (%)
PlasmaCon N	14.4	2.1	1.04
PlasmaCon L2	59.7	1.5	0.54

II. Correlation

A correlation study was performed using the Phosphoplastin RL Reagent (Y) and another thromboplastin reagent (X). One hundred five (105) plasma specimens, both normal and abnormal clinical samples were tested with both PT reagents. The linear regression equation and coefficient of determination (r^2) of the INR values were:

Method	N	R2	Equation
Photo-optical	105	0.98	Y = 1.065X – 0.1245
Mechanical	105	0.92	Y = 1.059X – 0.114

REFERENCE

1. Quick A.J., The Prothrombin Time in Hemophilia and in Obstructive Jaundice. J. Biol. Chem.: 109,73-74; 1935.
2. Biggs R. ed , Human Blood Coagulation Hemostasis and Thrombosis Second Ed. Blackwell Scientific Publications, London 1976.
3. Peterson C.E., Kwaan H.C., Current Concepts of Warfarin Therapy, Arch Intern. Med.146: 581-584, 1986.
4. Loeliger E.A.: ICEH/ICTH Recommendations for Reporting Prothrombin Time in Oral Anticoagulant Control, Throm. Haemost. 53: 155-156, 1985.

VERSION FRANÇAISE

APPLICATION

La Phosphoplastin RL est utilisée dans le test du temps de prothrombine (TP) en une seule étape et dans l'exploration de l'hémostase basée sur le TP. Le TP peut être utilisé pour dépister des troubles de la coagulation sanguine, dans l'analyse du facteur extrinsèque et dans le suivi thérapeutique du traitement par la Warfarine et médicaments associés.

PRINCIPE

En présence du calcium et du facteur VIIa (FVIIa), la thromboplastine des tissus active le facteur tissulaire par la voie extrinsèque de la coagulation. Les déficiences de la voie extrinsèque et de la voie commune prolongent le TP.

COMPOSITION

La Phosphoplastin RL contient un extrait salin liquide de cerveau de lapin, des ions de calcium, des conservateurs et des stabilisateurs. La Phosphoplastin RL est fournie en kits:

Référence catalogue 11-305: flacons 10 x 5 mL.
Référence catalogue 11-310: flacons 10 x 10 mL.

INSTRUCTIONS D'UTILISATION

La Phosphoplastin RL est prête à l'utilisation. Le flacon doit être retourné plusieurs fois afin d'obtenir une suspension homogène.

CONSERVATION ET STABILITÉ

La Phosphoplastin RL doit être conservée à des températures comprises entre 2 et 8°C; le produit est stable jusqu'à la date de péremption indiquée sur le flacon. Après ouverture, le produit est stable pour une période de quatorze (14) jours, lorsqu'il est conservé à des températures comprises entre 2 et 8°C. NE PAS CONGELER. Le réactif est une suspension fine de particules de cerveau de lapin. La présence de grandes particules floconneuses dans la suspension ou de durées de TP prolongées dans les tests d'échantillons normaux de plasma ou de contrôles peut indiquer la détérioration du produit.

PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES SPÉCIMENS

Le plasma est obtenu à partir du sang complet anti-coagulé par du citrate de sodium à 3,2% (1 vol. de citrate pour 9 vol. de sang entier). Les prélèvements de sang et de plasma doivent être manipulés selon les directives H21-A4 du CLSI (ou plus récentes).

MATÉRIEL ET ÉQUIPEMENTS NÉCESSAIRES MAIS NON FOURNIS

1. Analyseur de coagulation ou bain-marie à 37°C et minuteur
2. Cuvettes tests ou tubes à essai en plastiques d'analyse (12 x 75 mm)
3. Pipette automatique de 200 µL ou 100 µL.
4. Centrifugeuse
a. Eau distillée ou désionisée
6. Plasmas de contrôle, tels que les PlasmaCon N r2 Diagnostics (30-201), L1 (31-201), et L2 (32-201).

RÉALISATION DU TEST TP

REMARQUE : Tous les tubes de réaction, les seringues et les pipettes utilisées lors de la procédure doivent être en plastique.

I. Méthode automatique et semi-automatique

Pour des instructions plus détaillées, consulter le Manuel d'utilisation de l'instrument.

II. Méthode manuelle

7. Prélever et préparer les spécimens de sang en conformité avec les instructions détaillées dans la section PRÉLÈVEMENT ET MANIPULATION DES SPÉCIMENS.
8. Reconstituer les plasmas de contrôle selon les indications des notices présentes dans l'emballage.
9. Effectuer tous les tests en double.
10. Préchauffer le réactif TP à 37°C pendant au moins 10 minutes.
11. Préchauffez 100 µL de plasma test ou de plasma de contrôle pendant 2-3 minutes à 37°C.
12. Ajoutez 200 µL de réactif Phosphoplastin RL au plasma, en lançant un minuteur afin d'enregistrer la durée en secondes, nécessaire à la formation des caillots.

CONTRÔLE DE QUALITÉ

Chaque laboratoire doit établir un programme de contrôle de qualité incluant des contrôles normaux e anormaux pour évaluer la performance de l'équipement, du réactif et du technologue. Les contrôles normaux et anormaux doivent être testés tous les jours, avant de réaliser les tests sur le plasma des patients. La plage des valeurs de contrôle doit être redéfinie lors de chaque modification du numéro de lot des réactifs ou des contrôle, ou lors de chaque opération importante d'entretien des équipements. Si les produits de contrôle ne sont pas conformes aux valeurs de référence, les résultats des patients doivent être considérés sans valeur et ne doivent pas être considérés.

RÉSULTATS

Les résultats des tests de temps de prothrombine peuvent être exprimés en unités de secondes, % d'activité ou RIN. Les résultats supérieurs aux valeurs des limites supérieures doivent être considérés anormaux et les tests de suivi doivent être effectués. Les valeurs TP inférieures aux limites inférieures de la plage peuvent indiquer un échantillon ou un équipement défectueux et doivent être vérifiées.

LIMITATIONS

La Phosphoplastin RL doit être utilisée pour un diagnostique *in vitro* uniquement. Comme les valeurs attendues pour le test du temps de prothrombine varient d'un laboratoire à l'autre, en fonction de nombreuses variables, telles que le choix de la méthode de détection du caillot ou des conditions environnementales, les laboratoires doivent établir leurs propres plages de valeurs attendues pour les patients et des plages bien définies pour les plasmas de contrôle. L'utilisation d'échantillons ictériques, lipémiques ou hémolysés doit être évitée en raison des interférences possibles, particulièrement lors de l'utilisation d'instruments photo-optiques. L'impact d'autres médicaments thérapeutiques, ajoutés à une thérapie par anticoagulant oral, peut influencer l'interprétation des résultats des tests TP.

VALEURS ATTENDUES

Une étude concernant les plages des valeurs de référence, utilisant des spécimens triplés prélevés sur 120 adultes en parfaite santé, a été effectuée. Le nombre de femmes et d'hommes était pratiquement égal. Les résultats TP furent les suivants:

	Moyenne (secondes)	Plage pour +/- 2 SD
Photo-optiques	12,3	9,7-14,9 secondes
Mécaniques	12,6	11,1-14,1 secondes

Ces valeurs ne doivent être utilisées qu'à titre de référence. En raison des différences qui peuvent exister entre les instruments, les laboratoires et les populations locales, il est nécessaire que chaque laboratoire établisse sa propre plage de valeurs de référence pour les résultats de temps de prothrombine attendus.

DÉTERMINATION DU RIN

Le RIN est calculé sur la base du rapport entre le TP du patient et la moyenne des valeurs normales de référence élevé à la puissance de l'Index international de sensibilité (IIS).

$$\textbf{RIN = (TP du Patient / moyenne de la plage normale)}^{\text{IIS}}$$

L'IIS est attribué par comparaison à un matériel standard de l'OMS, référence pour la thromboplastine. Plus les valeurs IIS sont réduites pour un réactif donné, plus ce réactif est sensible aux facteurs de coagulation. La valeur de lot spécifique pour IIS pour Phosphoplastin RL est indiquée sur le panneau frontal de l'emballage extérieur.

CARACTÉRISTIQUES DE PERFORMANCE

I. Précision

Des études de précision ont été réalisés pour déterminer la VF pour la même analyse et pour des analyses successives pour le plasma normal de contrôle et le plasma anormal de contrôle. Un numéro de lot unique de Phosphoplastin RL a été utilisé pour ces études. Les résultats sont indiqués ci-dessous.

Détection photo-optique de caillots

Plasma de contrôle	TP moyen (sec)	VF Même analyse (%)	VF Analyses successives (%)
PlasmaCon N	12,7	0,7	1,03
PlasmaCon L2	52,9	1,9	1,31

Détection mécanique des caillots

Plasma de contrôle	TP moyen (sec)	VF Même analyse (%)	VF Analyses successives (%)
PlasmaCon N	14.4	2.1	1.04
PlasmaCon L2	59.7	1.5	0.54

II. Corrélation

Une étude de corrélation a été effectuée utilisant le réactif Phosphoplastin RL (Y) et un autre réactif de thromboplastine (X). Cent cinq spécimens de plasma (105), des échantillons normaux et anormaux, ont été testés avec les deux réactifs TP. L'équation de régression linéaire et le coefficient de détermination (r^2) des valeurs INR étaient:

Méthode	N	R2	Équation
Photo-optiques	105	0,98	Y = 1,065X – 0,1245
Mécaniques	105	0,92	Y = 1,059X – 0,114

RÉFÉRENCE

1. Quick A.J., The Prothrombin Time in Hemophilia and in Obstructive Jaundice (Le temps de la prothrombine dans l'hémophilie et la jaunice obstructive). J. Biol. Chem.: 109,73-74; 1935.
2. Biggs R. ed , Human Blood Coagulation Hemostasis and Thrombosis (Thrombose et hémostase de coagulation du sang humain), Deuxième Edition Blackwell Scientific Publications, Londres 1976.
3. Peterson C.E., Kwaan H.C., Current Concepts of Warfarin Therapy (Concepts actuels de la thérapie à base de Warfarine), Arch Intern. Med.146: 581-584, 1986.
4. Loeliger E.A.: ICEH/ICTH Recommendations for Reporting Prothrombin Time in Oral Anticoagulant Control (Recommandations pour signaler le temps de la prothrombine dans le contrôle oral de l'anti-coagulation) , Throm. Haemost. 53: 155-156, 1985.

DEUTSCHE VERSION

VERWENDUNGSZWECK

Phosphoplastin RL ist vorgesehen zur Verwendung im einstufigen Prothrombinzeit(PT)-Test und in PT-basierten Hämostase-Assays. Die PT kann für das Screening auf Koagulopathien, für Extrinsic-Faktor-Assays und Therapiekontrolle von Warfarin und verwandten Medikamenten verwendet werden.

PRINZIP

Gewebe-Thromboplastin aktiviert in Gegenwart von Kalzium und FVIIa das extrinsische System der Koagulationskaskade. Defekte im extrinsischen System und der gemeinsamen Endstrecke der Koagulationskaskade verlängern die PT.

ZUSAMMENSETZUNG

Phosphoplastin RL besteht aus einem flüssigen Salzextrakt aus Kaninchengehirn, Kalziumionen, Konservierungsmitteln und Stabilisatoren. Phosphoplastin RL wird in abgepackten Kits geliefert:

Katalognummer 11-305: 10 x 5 mL Fläschchen.
Katalognummer 11-310: 10 x 10 mL Fläschchen.

VORBEREITUNG FÜR DIE VERWENDUNG

Phosphoplastin RL wird gebrauchsfertig geliefert. Die Fläschchen sollten mehrmals umgedreht werden, um eine homogene Suspension zu erhalten.

LAGERUNG UND STABILITÄT

Phosphoplastin RL sollte bei 2 bis 8°C gelagert werden und ist bis zu dem auf dem Fläschchen angegebenen Verfallsdatum stabil. Nach dem Öffnen und bei Lagerung bei einer Temperatur von 2 bis 8°C ist die ursprüngliche Aktivität vierzehn (14) Tage lang stabil. NICHT EINFRIEREN. Das Reagenz ist eine feine Suspension von Partikeln aus Kaninchengehirn. Große, flockige Partikel in der Suspension oder verlängerte PT-Zeiten beim Testen von normalem Plasma oder von Kontrollen können auf eine Zersetzung des Produkts hindeuten.

PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG

Das Plasma wird aus Vollblut gewonnen, das mit 1 Teil 3,2%-igem Natriumzitrat zu 9 Teilen Vollblut antikoaguliert wurde. Die Behandlung des entnommenen Vollbluts und die Handhabung des Plasmas sollten entsprechend der CLSI-Richtlinie H21-A4 (oder der sie ersetzenden Folgerichtlinie) durchgeführt werden.

ERFORDERLICHE, NICHT MITGELIEFERTE MATERIALIEN UND AUSSTATTUNG

1. Koagulationsinstrument oder 37 °C Wasserbad und Stoppuhr
2. Reagenzgefäße oder Plastikteströhrchen (12 x 75 mm)
3. Pipette für 200 µL oder 100 µL.
4. Zentrifuge
5. Destilliertes oder entionisiertes Wasser
6. Kontrollplasma wie z.B. r2 Diagnostics PlasmaCon N (30-201), L1 (31-201) und L2 (32-201).

TESTVERFAHREN FÜR PT

HINWEIS: Sämtliche während des Verfahrens verwendeten Teströhrchen, Spritzen und Pipetten sollten aus Plastik hergestellt sein.

I. Automatische und halbautomatische Methoden

Eine ausführliche Gebrauchsanweisung finden Sie im Benutzerhandbuch für das entsprechende Gerät.

II. Manuelle Methode

13. Die Blutproben entsprechend der Anleitung unter PROBENENTNAHME UND HANDHABUNG entnehmen und vorbereiten.
14. Die Kontrollplasmen entsprechend der jeweiligen Packungsbeilage rekonstituieren.
15. Alle Tests in Duplikaten durchführen.
16. Das PT-Reagenz mindestens 10 Minuten auf 37 °C vorwärmen.
17. 100 µL des Test- oder Kontrollplasmas 2 – 3 Minuten bei 37 °C vorwärmen.
18. 200 µL Phosphoplastin RL-Reagenz zum Plasma hinzufügen und gleichzeitig die Stoppuhr starten, um die für die Bildung eines Gerinnsels benötigte Zeit in Sekunden zu messen.

QUALITÄTSKONTROLLE

Jedes Labor sollte ein Verfahren zur Qualitätskontrolle entwickeln, das normale und abweichende Kontrollen zur Evaluierung der Leistung des Geräts, des Reagenz und der Arbeitsweise des Untersuchers einschließt. Die normalen und abweichenden Kontrollen sollten täglich vor der Durchführung der Tests von Patientenplasma getestet werden. Die Kontrollbereiche sollten bei jeder Veränderung der Losnummer des Reagenz oder der Kontrolle oder bei jeder umfangreicheren Wartung des Geräts erneut festgelegt werden. Wenn die Kontrollen nicht (wieder) innerhalb der Referenzbereiche liegen, sind die Ergebnisse der Patientenproben als ungültig zu betrachten und dürfen nicht ausgegeben werden.

ERGEBNISSE

Die Ergebnisse der Prothrombinzeit-Tests können in Sekunden, % Aktivität oder INR angegeben werden. Ergebnisse, die über der Obergrenze des Bereichs liegen, sind als abweichend zu betrachten, und eine Nachfolgeuntersuchung sollte durchgeführt werden. PT-Werte, die unterhalb der Untergrenze des Bereichs liegen, können auf eine verunreinigte Probe hindeuten oder das Gerät sollte überprüft werden.

EINSCHRÄNKUNGEN

Phosphoplastin RL ist ausschließlich zur Verwendung als *in vitro*-Diagnostikum geeignet. Da die zu erwartenden Werte für den Prothrombinzeit-Test je nach Labor abhängig sind von zahlreichen Variablen wie z.B. der Wahl des Verfahrens zur Gerinnungskontrolle oder den Umgebungsbedingungen, sollte jedes Labor seine eigenen zu erwartenden Patientenwerte und klar definierten Bereiche für die Kontrollplasmen festlegen. Die Verwendung von ikterischen, lipämischen oder hämolysierten Proben sollte aufgrund einer möglichen Interferenz, besonders bei der Verwendung photooptischer Geräte, vermieden werden. Die Wirkung anderer Medikamente zusätzlich zu einer oralen Antikoagulanzientherapie kann die Interpretation der PT-Testergebnisse beeinflussen.

ZU ERWARTENDE WERTE

Eine Studie zum Referenzbereich wurde unter Verwendung dreifacher Proben von 120 gesunden Erwachsenen durchgeführt. Es wurde ungefähr die gleiche Anzahl von Männern und Frauen in die Studie aufgenommen. Die Ergebnisse der PT-Tests waren wie folgt:

	Mittelwert (Sekunden)	Bereich für +/- 2 SD
Photooptisch	12,3	9,7 – 14,9 Sekunden
Mechanisch	12,6	11,1 – 14,1 Sekunden

Diese Werte sollten nur als Richtlinien dienen. Da zwischen den Geräten, Labors und der örtlichen Bevölkerung Unterschiede vorhanden sein können, muss jedes Labor seinen eigenen Referenzbereich zu erwartender Ergebnisse bezüglich der Prothrombinzeit festlegen.

BESTIMMUNG DES INR

Der INR wird berechnet mit dem Quotienten aus der Patienten-PT und dem Mittelwert des normalen Referenzbereichs als Basis und dem Internationalen Sensitivitätsindex (ISI) für das jeweilige Testreagenz als Exponent.

$$\textbf{INR = (Patienten-PT/Mittelwert Normalbereich)}^{\text{ISI}}$$

Der ISI-Wert wird aufgrund des Abgleichs mit einem hochempfindlichen WHO-Standardreferenzmaterial für Thromboplastin zugeordnet. Je niedriger der ISI-Wert eines gegebenen Reagenz ist, desto empfindlicher ist das Reagenz gegenüber Koagulationsfaktoren. Der los-spezifische ISI-Wert für Phosphoplastin RL findet sich auf der Vorderseite des Außenkartons.

LEISTUNGSMERKMALE

I. Präzision

Es wurden Präzisionsstudien zur Bestimmung der Intra- und Inter-Assay-Varianzkoeffizienten für normales und abweichendes Kontrollplasma durchgeführt. Für diese Studien wurde eine einzige Losnummer des Phosphoplastin RL-Reagenz verwendet. Die Ergebnisse sind unten dargestellt.

Photooptische Gerinnungskontrolle

Kontroll-plasma	Mittelwert PT (Sek.)	Intra-Assay-Varianzko-effizient (%)	Inter-Assay-Varianzko-effizient (%)
PlasmaCon N	12,7	0,7	1,03
PlasmaCon L2	52,9	1,9	1,31

Mechanische Gerinnungskontrolle

Kontroll-plasma	Mittlere PT (Sek.)	Intra-Assay-Varianzko-effizient (%)	Inter-Assay-Varianzko-effizient (%)
PlasmaCon N	14,4	2,1	1,04
PlasmaCon L2	59,7	1,5	0,54

II. Korrelation

Mit dem Phosphoplastin RL-Reagenz (Y) und einem anderen Thromboplastin-Reagenz (X) wurde eine Korrelationsstudie durchgeführt. Einhundertundfünf (105) Plasmaproben, sowohl normale als auch abweichende klinische Proben, wurden mit beiden PT-Reagenzien getestet. Die lineare Regressionsgleichung und das Bestimmtheitsmaß (r^2) der INR-Werte waren:

Methode	N	R2	Gleichung
Photooptisch	105	0,98	Y = 1,065X – 0,1245
Mechanisch	105	0,92	Y = 1,059X – 0,114

LITERATUR

1. Quick A.J., The Prothrombin Time in Hemophilia and in Obstructive Jaundice. J. Biol. Chem.: 109,73-74; 1935.
2. Biggs R. ed , Human Blood Coagulation Hemostasis and Thrombosis Second Ed. Blackwell Scientific Publications, London 1976.
3. Peterson C.E., Kwaan H.C., Current Concepts of Warfarin Therapy, Arch Intern. Med.146: 581-584, 1986.

4. Loeliger E.A.: ICEH/ICTH Recommendations for Reporting Prothrombin Time in Oral Anticoagulant Control, Throm. Haemost. 53: 155-156, 1985.

VERSIONE ITALIANA

USO PREVISTO

Phosphoplastin RL è stato sviluppato per la misurazione "one-stage" del tempo di protrombina (prothrombin time, PT) e per la valutazione dell'emostasi basata sul PT. Il PT può essere utilizzato per individuare la presenza di coagulopatie, per la valutazione dei fattori estrinsechi, e per il monitoraggio terapeutico di warfarin e di farmaci associati.

PRINCIPIO

In presenza di calcio e del FVIIa, la tromboplastina tissutale attiva il processo di coagulazione con il rilascio del fattore tissutale (via estrinseca). Le deficienze nel processo di coagulazione per via estrinseca ed intrinseca prolungano il PT.

COMPOSIZIONE

Phosphoplastin RL è costituito da una sostanza liquida salina estratta dal cervello del coniglio, da ioni calcio, da conservanti e stabilizzatori. Phosphoplastin RL viene fornito in kit confezionati:

Numero di catalogo 11-305: 10 fiale da 5 mL.
Numero di catalogo 11-310: 10 fiale da 10 mL.

PREPARAZIONE PRIMA DELL'UTILIZZO

Phosphoplastin RL viene fornito già pronto per essere utilizzato. La fiala deve essere capovolta più volte, fino ad ottenere una sospensione omogenea.

CONSERVAZIONE E STABILITÀ

Phosphoplastin RL deve essere conservato ad una temperatura tra i 2 e gli 8°C, ed è stabile fino alla data di scadenza indicata sulla fiala. Dopo l'apertura, se conservato ad una temperatura tra i 2 e gli 8°C, Phosphoplastin RL mantiene stabile la sua attività originaria per quattordici (14) giorni. NON METTERE NEL CONGELATORE. Il reattivo è una sospensione sottile di particelle del cervello del coniglio. Delle grosse particelle simili a fiocchi nella sospensione, o un PT prolungato rilevato in test di plasma normale o in controlli possono indicare un deterioramento del prodotto.

PRELIEVO E GESTIONE DEI CAMPIONI

Il plasma si ottiene dal sangue intero anticoagulato con 1 parte di sodio citrato 3,2% e 9 parti di sangue intero. Analizzare il sangue intero prelevato e maneggiare il plasma secondo le linee guida H21-A4 (o dell'edizione successiva) del CLSI.

MATERIALI E STRUMENTI NECESSARI, MA NON FORNITI

1. Strumento per la coagulazione, o bagnomaria a 37°C e timer
2. Recipienti di reazione o tubicini di plastica per test (12 x 75 mm)
3. Dispositivo a pipetta per il rilascio di 200 µL o 100 µL.
4. Centrifuga
5. Acqua distillata o deionizzata
6. Plasma di controllo, come PlasmaCon N (plasma di controllo normale) di r2 Diagnostics (30-201), L1 (31-201), e L2 (32-201).

PROCEDURA DI TEST PER LA MISURAZIONE DEL PT

NOTA: Durante la procedura, tutti i tubicini, le siringhe e le pipette per il test devono essere in plastica.

I. Metodi automatizzati e semi-automatizzati

Per istruzioni dettagliate, fare riferimento all'appropriato *Instrument Operator's Manual* (Manuale di istruzioni per l'operatore).

II. Metodo manuale

19. Prelevare e preparare il campione di sangue seguendo le istruzioni contenute nella sezione PRELIEVO E GESTIONE DEI CAMPIONI.
20. Ricostituire i plasmi di controllo secondo i relativi foglietti di istruzioni.
21. Eseguire tutti i test doppi.
22. Preriscaldare il reattivo per testare il PT a 37°C per almeno 10 minuti.
23. Preriscaldare 100 µL del plasma da testare o del plasma di controllo per 2-3 minuti a 37°C.
24. Aggiungere al plasma 200µL di reattivo Phosphoplastin RL, azionando contemporaneamente un cronografo e registrare il tempo – in secondi - necessario per la formazione di coaguli.

CONTROLLO QUALITÀ

Ogni laboratorio deve stabilire un programma di controllo qualità comprendente controlli di routine e non di routine per valutare le prestazioni degli strumenti, dei reattivi e dei tecnici. I controlli di routine e non di routine devono essere effettuati giornalmente, prima di effettuare i test sul plasma dei pazienti. I range di controllo devono essere ridefiniti ad ogni cambiamento del numero di lotto del reattivo o del controllo, o in caso di significativi interventi di manutenzione agli strumenti. Se i controlli non danno risultati all'interno dei loro range di riferimento, i risultati del paziente non devono essere considerati validi e non devono essere riportati.

RISULTATI

I risultati dei test di misurazione del tempo di protrombina possono essere indicati in unità di secondi, % di attività, o INR. I risultati al di sopra dei limiti superiori del range devono essere considerati anormali, e devono essere effettuati dei test di follow-up. I valori del PT al di sotto dei limiti inferiori del range possono indicare un campione compromesso o uno strumento difettoso, e devono essere analizzati.

LIMITAZIONI

Phosphoplastin RL è unicamente per uso diagnostico *in vitro*. Dato che i valori previsti risultanti dal test di misurazione del tempo di protrombina possono variare da un laboratorio all'altro, influenzati da numerose variabili, come la scelta del metodo di rilevazione dei coaguli, o le condizioni ambientali, i laboratori devono stabilire i propri valori attesi per i pazienti e dei range ben definiti per i plasmi di controllo. L'utilizzo di campioni itterici, lipemici o emolizzati deve essere evitato, data la possibile interferenza, specie nel caso vengano usati strumenti foto-ottici. L'impatto di altri farmaci terapeutici, in associazione alla terapia anticoagulante orale, può influenzare l'interpretazione dei risultati del test per la misurazione del PT.

VALORI ATTESI

È stato condotto uno studio dei range di riferimento con l'utilizzo di campioni triplici prelevati da 120 soggetti adulti sani normali. Soggetti maschi e femmine sono stati reclutati in numero approssimativamente uguale. I risultati del PT sono stati i seguenti:

	Tempo medio (secondi)	Range per +/- 2 SD
Rilevazione foto-ottica	12,3	9,7-14,9 secondi
Rilevazione meccanica	12,6	11,1-14,1 secondi

Questi valori sono da intendersi unicamente come linee guida. Dato che possono esserci delle differenze tra gli strumenti, i laboratori e le popolazioni locali, è necessario che ogni laboratorio stabilisca il proprio range di riferimento per i risultati del tempo di protrombina attesi.

DETERMINAZIONE DELL'INR

L'INR viene calcolato utilizzando il rapporto tra il PT del paziente e la media del normale range di riferimento elevato ad una potenza pari all'*International Sensitivity Index* (ISI) del reattivo.

$$\textbf{INR} = \textbf{(PT del paziente/ media del range normale)}^{ISI}$$

L'ISI viene assegnato tramite un confronto con del materiale di riferimento relativo allo standard WHO (World Health Organization) di tromboplastina altamente sensibile. Minore è l'ISI di un determinato reattivo, maggiore è la sensibilità del reattivo ai fattori della coagulazione. Il valore specifico dell'ISI relativo al lotto per Phosphoplastin RL è riportato sul lato frontale della confezione esterna.

CARATTERISTICHE DELLA PRESTAZIONE

I. Precisione

Sono stati condotti degli studi di precisione per stabilire i coefficienti di variazione (CV) intrasaggio ed intersaggio per il plasma di controllo normale ed il plasma di controllo anormale. Per questi sudi è stato utilizzato un unico numero di lotto di reattivo Phosphoplastin RL. I risultati sono riportati qui di seguito.

Rilevazione foto-ottica dei coaguli

Plasma di controllo	**PT medio (secondi)**	**CV intrasaggio (%)**	**CV intersaggio (%)**
PlasmaCon N	**12,7**	**0,7**	**1,03**
PlasmaCon L2	**52,9**	**1,9**	**1,31**

Rilevazione meccanica dei coaguli

Plasma di controllo	**PT medio (secondi)**	**CV intrasaggio (%)**	**CV intersaggio (%)**
PlasmaCon N	**14,4**	**2,1**	**1,04**
PlasmaCon L2	**59,7**	**1,5**	**0,54**

II. Correlazione

È stato effettuato uno studio di correlazione utilizzando il reattivo Phosphoplastin RL (Y) ed un altro reattivo costituito da tromboplastina (X). Centocinque (105) campioni di plasma, campioni clinici sia normali, sia anormali, sono stati sottoposti a test con entrambi i reattivi per la misurazione del PT. L'equazione di regressione lineare ed il coefficiente di determinazione (r^2) dei valori dell'INR sono stati:

Metodo	N	R2	Equazione
Rilevazione foto-ottica	105	0,98	Y = 1,065X – 0,1245
Rilevazione meccanica	105	0,92	Y = 1,059X – 0,114

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

1. Quick A.J., The Prothrombin Time in Hemophilia and in Obstructive Jaundice. J. Biol. Chem.: 109,73-74; 1935.
2. Biggs R. ed , Human Blood Coagulation Hemostasis and Thrombosis Second Ed. Blackwell Scientific Publications, London 1976.
3. Peterson C.E., Kwaan H.C., Current Concepts of Warfarin Therapy, Arch Intern. Med.146: 581-584, 1986.
4. Loeliger E.A.: ICEH/ICTH Recommendations for Reporting Prothrombin Time in Oral Anticoagulant Control, Throm. Haemost. 53: 155-156, 1985.

VERSIÓN ESPAÑOLA

USO PREVISTO

Phosphoplastin RL ha sido diseñado para su uso en la prueba del tiempo de protrombina (TP) en una etapa y en los ensayos de la hemostasia basada en el TP. El TP puede utilizarse para detectar coagulopatías, en pruebas de cianocobalamina y en el control terapéutico de la warfarina y de medicamentos afines.

PRINCIPIO

La tromboplastina hística en presencia de calcio y de FVIIa activa la vía (extrínseca) de la tromboplastina hística (factor III de la coagulación). Las deficiencias en las vías comunes y extrínsecas aumentan el TP.

COMPOSICIÓN

Phosphoplastin RL consiste en un extracto salino líquido de cerebro de conejo, iones calcio, conservantes y estabilizantes. Phosphoplastin RL se entrega en forma de kits envasados:

Referencia 11-305: 10 viales de 5 mL.
Referencia 11-310: 10 viales de 10 mL.

PREPARACIÓN PARA EL USO

Phosphoplastin RL se suministra listo para su uso. El vial debe invertirse en varias ocasiones hasta obtener una suspensión homogénea.

ALMACENAMIENTO Y ESTABILIDAD

Phosphoplastin RL debe almacenarse a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C y permanece estable hasta la fecha de caducidad indicada en el vial. Una vez abierto, la actividad original permanece estable durante catorce (14) días si se conserva a una temperatura comprendida entre 2 y 8 °C. NO CONGELAR. El reactivo es una suspensión fina de partículas de cerebro de conejo. La presencia de grandes partículas en suspensión o tiempos de TP prolongados en pruebas de plasma normal o en los controles pueden indicar el deterioro del producto.

MANIPULACIÓN Y RECOGIDA DE LA MUESTRA

El plasma se obtiene a partir de sangre completa anticoagulada con 1 parte de citrato sódico al 3,2% por 9 partes de sangre completa. Procese la sangre completa recogida y manipule el plasma de acuerdo con la directriz H21-A4 del CLSI (o la edición posterior).

MATERIALES Y EQUIPO NECESARIOS NO INCLUIDOS

1. Equipo de coagulación o baño de agua a 37 °C y cronómetro
2. Copas de reacción o tubos de ensayo de plástico (12 x 75 mm)
3. Pipeta para 200 µL o 100 µL.
4. Centrífuga
5. Agua destilada o desionizada
6. Plasmas de control, tal como r2 Diagnostics PlasmaCon N (30-201), L1 (31-201) y L2 (32-201).

PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA PARA EL TP

NOTA: todos los tubos de ensayo, las jeringuillas y las pipetas utilizadas durante el procedimiento deben ser de plástico.

I. Métodos automáticos y semiautomáticos

Consulte el manual del usuario de los equipos pertinentes para obtener instrucciones detalladas.

II. Método manual

25. Extraiga y prepare la muestra de sangre siguiendo lo indicado en MANIPULACIÓN Y RECOGIDA DE LA MUESTRA.
26. Reconstituya los plasmas de control según se explica en los prospectos correspondientes.
27. Realice todas las pruebas por duplicado.
28. Precaliente el reactivo del TP a 37 °C durante un mínimo de 10 minutos.
29. Precaliente 100 µL del plasma de la prueba o del plasma control durante 2-3 minutos a 37 °C.
30. Añada 200 µL de reactivo Phosphoplastin RL al plasma y, al mismo tiempo, inicie el cronómetro para registrar el tiempo en segundos necesario para la formación de coágulos.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio debe fijar un programa de control de calidad que incluya controles normales y anormales para evaluar el equipo, el reactivo y la actuación del técnico. Los controles normales y anormales deben realizarse diariamente antes de llevar a cabo pruebas con plasma de pacientes. Deben restablecerse los intervalos de control tras cualquier modificación en el número de lote del reactivo o control, o tras un uso importante del equipo. Si los controles no se recuperan dentro de sus intervalos de referencia, los resultados del paciente deben considerarse inválidos y no deben registrarse.

RESULTADOS

Los resultados de las pruebas de tiempo de protrombina pueden registrarse en segundos, % de actividad o IIN. Los resultados mayores que los límites superiores del intervalo deben considerarse anormales y deberán realizarse pruebas de seguimiento. Los valores del TP por debajo de los límites inferiores del intervalo pueden indicar una muestra o un equipo dudosos y deben investigarse.

LÍMITES

Phosphoplastin RL ha sido diseñado únicamente para diagnósticos *in vitro*. Debido a que los valores esperados para el tiempo de protrombina pueden variar de un laboratorio a otro dependiendo de numerosas variables, como la elección del método de detección de coágulos o las condiciones ambientales, los laboratorios deben establecer sus propios valores esperados para los pacientes y definir adecuadamente los intervalos correspondientes a los plasmas de control. Debe evitarse el uso de muestras ictéricas, lipémicas o hemolizadas debido a la posible interferencia, especialmente cuando se utilizan instrumentos foto-ópticos. El efecto de otros medicamentos, además del tratamiento con anticoagulante oral, puede influir la interpretación de los resultados de la prueba del TP.

VALORES ESPERADOS

Se realizó un estudio para obtener un intervalo de referencia utilizando muestras triplicadas de 120 adultos sanos normales. Se utilizó un número de hombres y mujeres aproximadamente igual. Los resultados del TP fueron los siguientes:

	Media (segundos)	Intervalo para +/- 2 DT
Foto-óptico	12,3	9,7-14,9 segundos
Mecánico	12,6	11,1-14,1 segundos

Estos valores deben utilizarse exclusivamente como orientación. Debido a las diferencias que pueden existir entre diferentes instrumentos, laboratorios y poblaciones locales, resulta necesario que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia para los resultados esperados de tiempo de protrombina.

DETERMINACIÓN DEL IIN

El IIN se calcula utilizando el cociente entre el TP del paciente y la media del intervalo de referencia normal elevado a la potencia del índice internacional de sensibilidad (IIS) del reactivo.

$$\textbf{IIN} = \textbf{(TP del paciente/media del intervalo normal)}^{IIS}$$

El IIS se asigna por comparación con un material de referencia estándar de tromboplastina muy sensible de la OMS. Cuanto más bajo sea el IIS para un reactivo dado, más sensible será el reactivo a los factores de la coagulación. El valor del IIS específico de cada lote de Phosphoplastin RL puede encontrarse en la parte frontal de la caja exterior.

PERFORMANCE CHARACTERISTICS

CARACTERÍSTICAS DE RENDIMIENTO

I. Precisión

Se realizaron estudios de precisión para establecer los CV intraanálisis y entre análisis para el plasma control normal y el plasma control anormal. Para estos estudios únicamente se utilizó un número de lote de reactivo Phosphoplastin RL. Los resultados se muestran a continuación.

Detección foto-óptia del coágulo

Plasma Control	**TP medio (s)**	**CV intraanálisis (%)**	**CV entre análisis (%)**
PlasmaCon N	**12,7**	**0,7**	**1,03**
PlasmaCon L2	**52,9**	**1,9**	**1,31**

Mechanical clot detection

Plasma Control	**TP medio (s))**	**CV intraanálisis (%)**	**CV entre análisis (%)**
PlasmaCon N	**14,4**	**2,1**	**1,04**
PlasmaCon L2	**59,7**	**1,5**	**0,54**

II. Correlación

Se realizó un estudio de correlación utilizando reactivo Phosphoplastin RL (Y) y otro reactivo de tromboplastina (X). Se probaron ciento cinco (105) muestras de plasma, tanto muestras clínicas normales como anormales, con ambos reactivos de TP. La ecuación de la regresión lineal y el coeficiente de determinación (r2) de los valores del IIN fueron:

Método	N	R2	Ecuación
Foto-óptico	105	0.98	Y = 1,065X – 0,1245
Mecánico	105	0.92	Y = 1,059X – 0,114

BIBLIOGRAFÍA

1. Quick A.J., The Prothrombin Time in Hemophilia and in Obstructive Jaundice. J. Biol. Chem.: 109,73-74; 1935.
2. Biggs R. ed , Human Blood Coagulation Hemostasis and Thrombosis Second Ed. Blackwell Scientific Publications, London 1976.
3. Peterson C.E., Kwaan H.C., Current Concepts of Warfarin Therapy, Arch Intern. Med.146: 581-584, 1986.
4. Loeliger E.A.: ICEH/ICTH Recommendations for Reporting Prothrombin Time in Oral Anticoagulant Control, Throm. Haemost. 53: 155-156, 1985.

